

氏 名	廣瀬 正明
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	第 5546 号
学位授与年月日	平成 22 年 9 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項
学位論文名	医薬用遺伝子組換え蛋白質の評価と医用材料としての応用
論文審査委員	主 査 教 授 田 辺 利 住                      副 査 教 授 東 雅 之 副 査 教 授 長 崎 健

## 論文内容の要旨

遺伝子組換え蛋白質を医薬として使用するに当たっては、生産された蛋白質の構造や性状を厳密に評価・確認しなければならない。また近年注目されている再生医療などで使用する医用材料への応用は、天然材料よりも組換え蛋白質を使用した方が、安全性や供給の安定性など多くの利点がある。

本論文では、*Pichia pastoris* で産生した組換えヒト血清アルブミン（rHSA）とチャイニーズハムスター卵巣細胞で産生した組換えアンチトロンビン（rAT）の構造・物性分析、rHSA を用いたハイドロゲルの調製とその薬物徐放担体としての評価並びに再生医療用細胞足場としての応用可能性を検討した。

第 1 章では、本論文の研究背景として、遺伝子工学を利用したバイオ医薬品を取り巻く状況、血清アルブミンおよびアンチトロンビンについて概説した。

第 2 章では、*Pichia pastoris* で産生した rHSA の構造を分析し、血漿由来 HSA (pHSA) と比較し、それらの構造が同等であることを示した結果について述べた。

第 3 章では、rHSA に含まれる分子内ジスルフィド（SS）結合の解析を行ない、遊離型システイン残基の位置とその他の 17 対の全 SS 結合位置を決定し、pHSA と同等であることを明らかにした。

第 4 章では、rAT 調製法を検討した結果について述べた。pH 7.2～7.5 で精製を行うと、ラテント型（変性体）やプレラテント型（半変性体）を生じ、精製標品の比活性が低下する問題点があった。精製を pH 7.5～8.0 で行うことによりこれらを低減でき、血漿由来 AT（pAT）と同程度の比活性をもつ精製品が得られることを明らかにした。

第 5 章では、rAT の糖鎖構造と薬理作用を比較した結果について述べた。rAT の N 型糖鎖の構造は pAT と異なるが、酵素阻害活性やラット疾患モデルでの薬理作用、薬物動態において、両 AT 間には顕著な違いがないことを明らかにした。

第 6 章では、rHSA を DTT により還元することで調製したハイドロゲルのドラッグデリバリー担体及び細胞足場としての評価を行なった結果について述べた。rHSA ハイドロゲルでは、ハイドロゲルとしての薬剤液包含効果だけでなく、HSA が有する薬剤結合性により薬物が担持される。それにより、薬剤担持量の増加と高い徐放性が得られることを明らかにした。蛋白質である rAT にも持続的放出が認められ、種々の生理活性蛋白質徐放担体になりうることを示した。また、ハイドロゲル上で線維芽細胞が良好に接着、増殖したことより、再生医療での足場としても応用できることを明らかにした。

最後に以上の研究結果を総括した。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は医薬品を目的として産生された遺伝子組換え蛋白質の性状分析、効力試験およびそのドラッグデリバリー担体への応用についての研究結果をまとめたものである。

第 1 章では、遺伝子組換えバイオ医薬品の実績、組換えヒト血清アルブミン（rHSA）、組換えアンチトロンビン（rAT）に関する概説など研究の背景と目的について述べている。

第 2 章では、ピキア酵母で産生した rHSA と血漿由来 HSA (pHSA) の構造を比較し、rHSA と pHSA が構造上同等であることを明らかにしている。

第 3 章では、ピキア酵母で産生した rHSA に含まれる分子内ジスルフィド（SS）結合を解析し、遊

離型システイン残基の位置と全 SS 結合位置を決定し、pHSA と同等であることを示している。

第 4 章では、チャイニーズハムスター卵巣細胞で産生した rAT の精製法検討と性状分析の結果について述べている。通常使用される pH7.2~7.5 で精製を行なった rAT は比活性の低いラレント型やプレラレント型を含むため、pAT よりも比活性が低いという問題点があった。著者は精製法を検討し、pH7.5~8.0 で精製することで低比活性分子種を低減でき、pAT と同程度の比活性を持つ精製品が得られることを明らかにしている。

第 5 章では、rAT と pAT の糖鎖構造及び薬理作用を比較し、両 AT で N 型糖鎖構造が異なるものの、酵素阻害活性やラット疾患モデルでの薬理作用、薬物動態に顕著な違いがないことを明らかにしている。

第 6 章では、rHSA から DTT 還元により調製したハイドロゲルのドラッグデリバリー担体としての評価結果について述べている。rHSA ハイドロゲルでは、ハイドロゲルの薬剤液保持効果だけでなく HSA の薬剤結合性が反映され、薬剤の担持量が増加し徐放効果も高くなることを明らかにしている。さらに、rAT にも持続的放出が認められ、rHSA ハイドロゲルが種々の生理活性蛋白質徐放担体になりうることを示している。

以上のように、本論文の著者は遺伝子組換え蛋白質の詳細な解析を行ない、医薬品としての評価に貢献している。さらに組換え蛋白質が医用材料に利用できることも示している。これらの成果は、遺伝子工学、医用材料工学の進展に寄与するところが大きく、本論文の著者は、博士（工学）の学位を受ける資格を有するものと認める。